

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-200050

(43)Date of publication of application : 24.07.2001

(51)Int.Cl. C08G 65/326
C07F 1/12
C08G 65/328
C09B 67/46
C09C 3/10
G01N 21/65
// B01J 13/00

(21)Application number : 2000-007476

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY
CORP

(22)Date of filing : 17.01.2000

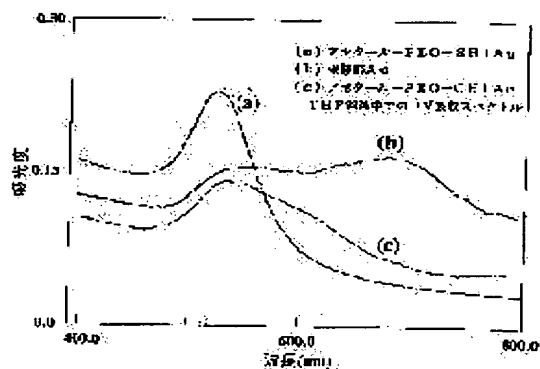
(72)Inventor : KATAOKA KAZUNORI
NAGASAKI YUKIO
KATO MASAO
OTSUKA HIDENORI
AKIYAMA YOSHITSUGU

(54) POLYETHYLENE GLYCOLIZED METAL, METAL OXIDE, OR ULTRAFINE SEMICONDUCTOR PARTICLE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a complex of metal colloid, metal oxide colloid or ultrafine semiconductor particles improved in the dispersion stability of a metal, metal oxide, or ultrafine semiconductor particles and in their reaction with functional compounds (groups with reaction specificity, or the like).

SOLUTION: An ultrafine particle complex of a polyethylene glycol derivative having a mercapto group or a silanol group at its α -end and a functional compound-reactive functional group at its ω -end with metal colloid, metal oxide colloid, or ultrafine semiconductor particles is provided.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

03.06.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-200050

(P 2 0 0 1 - 2 0 0 0 5 0 A)

(43)公開日 平成13年 7月24日 (2001. 7. 24)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C08G 65/326		C08G 65/326	2G043
C07F 1/12		C07F 1/12	4G065
C08G 65/328		C08G 65/328	4H048
C09B 67/46		C09B 67/46	B 4J005
C09C 3/10		C09C 3/10	4J037

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-7476 (P 2000-7476)

(22)出願日 平成12年 1月17日 (2000. 1. 17)

特許法第30条第 1 項適用申請有り 平成11年 9月20日
社団法人高分子学会発行の「高分子学会予稿集48巻14号」に発表

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

(72)発明者 片岡 一則

千葉県柏市大室1083-4 柏ビレッジ141-9

(72)発明者 長崎 幸夫

茨城県北相馬郡守谷町かやき台 3-5-17

(72)発明者 加藤 政雄

茨城県つくば市上岡460-167

(74)代理人 100110168

弁理士 宮本 晴視

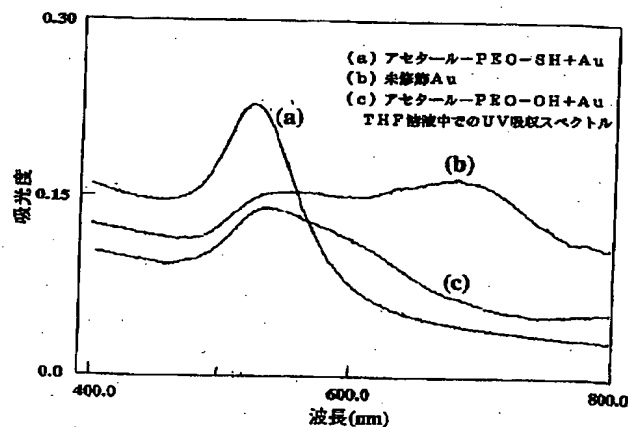
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリエチレングリコール化金属、金属酸化物または半導体超微粒子

(57)【要約】

【目的】 金属、金属酸化物または半導体超微粒子の分散安定性および機能性化合物（反応特異性の基等）との反応を改善した金属コロイド、金属酸化物コロイド或いは半導体超微粒子複合体の提供

【構成】 α -末端にメルカプト基またはシラノール基、 ω -末端に機能性化合物反応性官能基を有するポリエチレングリコール誘導体と金属コロイド、金属酸化物コロイド、または半導体超微粒子との超微粒子複合体



【特許請求の範囲】

【請求項1】 α -末端にメルカプト基またはシラノール基、 ω -末端に機能性化合物反応性官能基を有するポリエチレングリコール誘導体と金属コロイド、金属酸化物コロイドあるいは半導体超微粒子との超微粒子複合体。

【請求項2】 金属コロイドが金または銀であることを特徴とする請求項1に記載の金属コロイド複合体。

【請求項3】 ω -末端の官能基がアセタールであることを特徴とする請求項1または2に記載の金属コロイド、金属酸化物コロイドあるいは半導体超微粒子との超微粒子複合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 α -末端にメルカプト基またはシラノール基、 ω -末端に機能性化合物反応性官能基、例えばタンパク質に反応性アルデヒドを生成するアセタール基を有するヘテロテレケリツクポリエチレングリコール(PEG)誘導体を、金属コロイド、金属酸化物コロイド(マグネタイトなどの磁性粒子)或いは半導体超微粒子(CdSeなどの無機蛍光発光粒子)、特に金または銀コロイドに担持せしめ、PEGの ω -末端に機能性化合物反応性官能基を有する安定な金属、金属酸化物或いは半導体の超微粒子分散物に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、金属或いは金属酸化物コロイド

(超微粒子)は、医療[医薬(超微粒子の細内網系への浸透)として、各種検査薬、DDSとして]、染料

(塗料)、食品や触媒など、様々な分野で広く応用されている重要な工業材料の一つである[例えば、文献：

「超微粒子—創造科学技術—」林 主税他編、三田(1988)参照、「超微粒子応用技術」日本粉体工業技術協会編、日刊工業新聞社(1986)、参照]。特に数十から数百ナノメートルサイズ(サブミクロン：メソサイズ等とも呼ばれている。)で、かつサイズのそろった金属粒子はラマンスペクトル、マイクロ波を利用した医療用診断剤や電子顕微鏡ラベル剤など高機能材料として期待されている。例えば、金属コロイド粒子を使用するアッセイ方法が開発されている。該方法は、金属コロイドを標識として利用するために標識すべき特異の結合部分を、吸着により金属コロイド上に結合させ、前記標識物質を検出、測定するものである。その原理は、超微粒子が共鳴ラマン散乱を表面増感効果により更に増大させることが知られており[表面—強化ラマン光散乱(Surface Enhanced Raman Scattering)、表面強化共鳴ラマン散乱(SERRS: Surface Enhanced Resonance Raman Scattering)]、また、金属コロイドが前記シグナル増強効果を示すことが発見され、このような金属コロイドの特性を利用するものである。このようにラマン光に対して前記効果を有する金属コロイドなどを標識に用い、これに反

応する種々の被検出物、例えば抗体またはリガンドとの反応生成物を前記効果を利用して検出することができる。また、被検物に特異的結合部位およびラマン標識物質(金属コロイドなど)に反応性の基の両方を有する物質、換言すれば媒介分子(intervening molecule)で前記ラマン標識物質(金属コロイドなど)で処理しておけば、そのような標識物質を用いて被検物を検出することができる。

【0003】ただ、このような金属微粒子は表面のイオンの反発力によって水のような媒体中で分散状態を維持できるが、反対電荷の基を持ったものが存在すると中和して凝集してしまう等、極めて不安定であり、凝集が起こりやすいのが欠点であった。このような問題点を解決するため、ポリエチレングリコール(PEGと記載する場合もある)のような水溶性でしかもモビリティの高い高分子の片末端を金属粒子に担持させ、その反発力に基づく安定化法が報告されている[たとえばW. P. Wuelfingら、J. Am. Chem. Soc. 120 (48), 12696-12697 (1998)]。しかしながら、たとえば珍断用微粒子を考えたとき、PEGを微粒子表面に担持させると、抗体等の機能基(反応特異性の基)との反応ができず、その利用が極めて制限されていた。このような問題点を解決するため、本発明者らはPEGの片末端(例えば、 α -末端)に金属、金属酸化物或いは半導体超微粒子に担持しうる官能基(反応する)を導入し、他末端(ω -末端)に抗体、タンパク質、染料など機能性化合物等と反応しうる官能基を導入したPEG誘導体を合成し、金属、金属酸化物または半導体超微粒子(これらをまとめて「金属超微粒子等」と表現する場合もある。)を前記官能基を導入したPEG誘導体を用いて分散安定性を改善すると共に、超微粒子表面から広がったPEG鎖他末端の機能性化合物等への反応性を持つ新しい分散安定複合体を調製することを考えた。

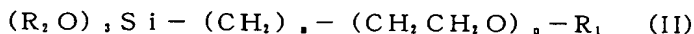
【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は金属超微粒子等の分散安定性を向上させるとともに様々な機能性化合物と反応可能な反応基を導入したPEG誘導体—金属超微粒子等の複合体を提供することにある。本発明者らは上述した分散安定でかつ反応性を有する金属微粒子等/PEG複合体を調製するために、各種ヘテロテレケリツクPEG誘導体の合成及び様々な金属微粒子等との複合化を研究してきたところ、片末端(例えば、 α -末端)にメルカプト基を有するヘテロテレケリツクPEGは、そのメルカプト基によって容易に金や銀などと金属と複合化することに成功した。さらには、片末端(例えば、 α -末端)にシラノール基を有するヘテロPEGを設計することによって、様々な超微粒子酸化金属等への複合化にも成功し、利用できる超微粒子の領域を広めることができることを発見した。超微粒子として半導体、例えばCdSを用いると、更に機能性を広げること

ができる。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、 α -末端にメルカプト基またはシラノール基、 ω -末端に機能性化合物反応性官能基を有するポリエチレングリコール誘導体と金属コロイド、金属酸化物コロイド、あるいは半導体超微粒子との超微粒子複合体であり、好ましくは、金属コロイドが金または銀であることを特徴とする前記金属コロイド複合体であり、更に好ましくは、 ω -末端の官能基がアセタールであることを特徴とする前記金属コロイド、金属酸化物コロイドあるいは半導体超微粒子との超微粒子複合体である。



(式中 R_2 は水素または炭素数1~5のアルキル基を示す。また、 m は1~10の任意の整数、 n は2~1000の任意の整数、 R_1 は水素、アセタール基、アルデヒド基、アミノ基、カルボキシル基、メタクリロイル基、アリル基を有するアルキル基より選ばれる)で示されるヘテロPEG (I I) のポリマーが用いられる。本発明者らは上述の目的を達成するポリマーとして、これまでに片末端にメルカプト基を有し、他末端に様々な官能基を有するヘテロテレケリックPEGの合成法を確立してきている〔特願平10-142098号(特開平11-322917号公報)、特開平7-48449号公報、特開平5-279469号公報(アミノ基)〕。他末端(ω -末端)の官能基としては、原理的にはどんな官能基も可能であるが、特に溶媒に反応しないものが好ましい。これまでの検討から、アセタール、アルデヒド、水酸基、アミノ基、カルボキシル基、活性エステルアジド基、メルカプト基、ビオチン基、単糖や2糖などのオリゴ糖、アミノ酸、核酸、アリル基、ビニルベンジル基、メタクリロイル基、アクリロイル基などが可能である。これらと金属、金属酸化物または半導体超微粒子とを反応させることによって本発明の金属コロイド、金属酸化物コロイド或いは半導体超微粒子複合体を調製することができる。

【0007】B. 金属微粒子は、市販品〔アルドリッチ、シグマ、ワコー社製など〕としても入手できるし、または $HAuCl_4$ 、 H_2PtCl_6 、 Na_2PtCl_6 、 $RhCl_3$ などの金属の希釈塩溶液を還元、シトレート還元または水素ガス還元などによって製造することもできる。平均粒径50nm~200nm程度 of 金コロイドの溶液は520nm付近に吸収極大を有する光学特性を示す。

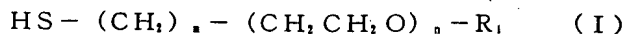
【0008】C. 複合体の調製

前記メルカプト基あるいはシラノール基を有するヘテロテレケリックPEGを金、銀やアルミ超微粒子と混合することにより微粒子表面とメルカプト基が反応し、安定な超微粒子-PEG複合体が調製できる。調製に用いる超微粒子としては様々な物質のものが使用可能である

【0006】

【本発明の実施の態様】本発明をより詳細に説明する。

A. 本発明で使用する、 α -末端にメルカプト基またはシラノール基、 ω -末端に機能性化合物反応性官能基を有するポリエチレングリコール誘導体は、下記の一般式(1)、または(2)で表すことができる。



(式中 m は1~10の任意の整数、 n は2から10000の任意の整数、 R_1 は水素、アセタール基、アルデヒド基、アミノ基、カルボキシル基、メタクリロイル基、アリル基を有するアルキル基より選ばれる)で示されるヘテロPEG、または、

が、金、銀やアルミニウムからのものはメルカプト基と合わせて安定に結合するため用いやすい。また、ケイ素やチタン、パラジウム、白金などのような触媒金属等の他、無機蛍光化合物として注目されているCdSや光触媒として脚光を浴びている酸化チタンなどの酸化物等の化合物粒子を使用する場合は、シラノール基を有するPEG (I I) と混合することにより、安定な本発明の複合体が調製できる。

【0009】本発明の複合体は様々な液体中で安定なため、調製溶剤は限定されないが、水やTHF、アルコールや芳香族化合物など、PEGの溶解性の高い溶剤が好ましい。調製する温度は液体の融点から沸点の間で可能であるが簡便のためには室温付近が適当である。粒子の径に関しては特に限定はないが、好ましい分散安定化のためには0.5nm~500 μ m、より好ましくは1nm~1 μ mである。複合体調製のためには通常前記PEG量を粒子に対して過剰量用いる。粒子数に対して通常3倍以上用いる必要があり、好ましくは10倍~10¹⁴倍、より好ましくは10³倍~10¹⁰倍が適当である。前記PEGの分子量には上限がないが、通常分子量100以上のものが使われる。好ましくは分子量200~100000、より好ましい分子量は300~20000程度である。調製後に遠心分離等を行い、過剰のPEGを除去することにより、純粋な金属超微粒子等の複合体が調製される。

【0010】

【実施例】具体例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。当業者であればこれらの例及び上述の実施の態様に記載の具体例を参考に、所望の金属超微粒子等/PEG複合体を提供できる。

1. α -末端にメルカプト基、 ω -末端にアセタール基を有するヘテロテレケリックPEGの合成。

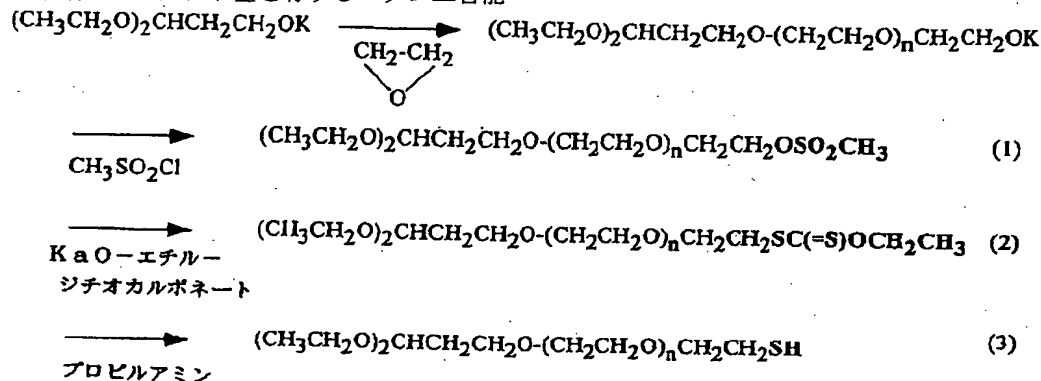
開始剤に3, 3-ジエトキシー-1-プロパノール(3,3-diethoxy-1-propanol)、停止剤にメチルスルホニルクロライド(Methylsulfonylchloride)を用いてアセタール基とメチルスルホニル基を有するヘテロ二官能性PEG (I) をアニオン重合により合成した。さらに、TH

F中でカリウムオルトエチルジチオカルボネート (potassium o-ethylthiocarbonat) と室温で3時間反応させることによってポリマー(2)を得た。その後、同じくTHF中でプロピルアミン (propylamine) との反応によってα-末端にメルカプト基を有するヘテロ二官能

性PEG(3)を合成した。前記合成反応を反応式1に示す。

[0011]

[化1]



【0012】また、得られた(1)～(3)の化合物の¹H-NMR(溶媒DMSO、400MHz)スペクトル図1に示す。

【0013】実施例1：金属超微粒子(金属コロイド) 20 複合体の調製

アセタール-PEO-SH(Mn=3200)とアセタール-PEO-OH(比較例)(Mn=3000)を金粒子とのモル比が5.0×10⁶になるように測りとり純水2.0mLに溶解させた。そして、NaOH溶液にてpH6.5に調製し、金コロイド1.0mL(2.58×10⁻¹³mol, pH6.5)を加え室温で3時間激しく攪拌させた。遠心分離[42,000g(gは重力加速度)、30分]後上着みを取り除き、残った溶液をTHF3mLに滴下し攪拌した。これらのサンプルについて吸収スペクトルを取り、特性解析を行った。このポリマーを用いた金粒子の調製においては、遠心分離後、THF溶液に再分散させたときのUV-visスペクトルから、未修飾の金粒子のUVスペクトル(図2b)は、粒子の凝集に基づく600nm以上に大きな吸収ピークを示していることが確認できた。アセタール-PEO-OH(c)は、未修飾の金粒子のUVスペクトルのように600nm以上に大きなピークを持たなかったものの、全体的にピークが高波長側へシフトし多少微粒子分散が不安定化していることが確認された(図2)。また、遠心操作後、pH3 40 の水溶液中に再分散させた時もアセタール-PEO-SH(図2a)のみが非常に安定であり、ベンゼンを用いた凍結乾燥後の再分散性もよいことが確認できた。

【0014】[粒子調製、酸系(塩酸を加えて酸性にした液体中における)分散安定性]アセタール-PEO-

SH(Mn=3200)を16.0mg、0.413mg(モル比:2×10⁷、6.0×10⁶)とアセタール-PEO-OH(Mn=3000)を15.5mg(モル比:2×10⁷)測りとり、純水2.0mLに溶解させ、NaOH溶液を加えてpHを6.6に調製した。そして、金コロイドを1.0mL(2.58×10⁻¹³mol, pH6.5)加えて室温で3時間攪拌させた。その後、遠心分離(42,000g、30分)をおこない溶液を取り除き、pH3のHCl水溶液3mLを加えて超音波をかけ再分散させた。その後、visスペクトルの測定を行った。遠心分離3回操作では金粒子単独及び水酸基末端PEGではその吸光度が減少していることから、凝集により溶液から分離されているのに対し、メルカプト末端PEGでは強い強度を保ち、安定化が確認された。

(図3)

【0015】本発明の分散粒子の特性(ゼータ電位)通常金微粒子の水溶液分散系では粒子表面を負に荷電させることによりそのチャージ反発により分散安定化させているのに対し、PEG化金微粒子ではその表面に全くチャージがないことがゼータ電位測定(大塚電子:ELS-8000)により確認された。すなわち、市販の金微粒子は-34.5mVであるのに対し、今回作成した金微粒子-ヘテロPEG複合体(アセタール-PEG-SH/Au)では-0.86mVとなっており、殆ど誤差の範囲で粒子表面にチャージがないといえ、表面がPEG鎖で覆われているものと推測される。測定データを表1に示す。

【0016】

[表1]

アセタール-PEG-SH/金(Au)粒子のゼータ電位

サンプル	ゼータ電位 (mV)
未修飾金粒子	-34.5
アセタール-PEG-SH/Au	-0.86 (3回の平均値)

測定溶液:

緩衝剤 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 10mM (モル濃度) 加え、そのイオン強度を 0.015、pH を 7.5 に調整したリン酸緩衝溶液。

測定機器: ELS-8000 (大塚電子)

【0017】本発明の超微粒子複合体の利用例
得られた金超微粒子(コロイド)/PEG複合体は酸性下でアセタールが加水分解し、アルデヒド化している。この溶液にアルデヒドの蛍光試薬であるDDB (4,5-Dimethoxy-1,2-diaminobenzene \cdot 2HCl) を添加したところ 400nm 付近に強い蛍光を発し(励起338nm)粒子表面にアルデヒドが存在していることが確認された。アルデヒド基はタンパクのアミノ基と還元アミノ化で結合するので、タンパク質の検出に利用できる。

【0018】

【発明の効果】以上述べたように、本発明で得られた金属或いは金属酸化物コロイド(超微粒子)複合体は、凝集を起こしやすい環境において、金属或いは金属酸化物コロイド(超微粒子)を安定に保ち、超微粒子の特性を生かした、医療[医薬(超微粒子の細内網系への浸透)

として、各種検査薬、DDSとして)、染料(発色性の変化)(塗料としての、例えば酸化チタンでは光触媒性の変化、マグネタイトなどの磁性粒子では記憶性の変化など)、食品(吸収性)、や触媒(機能の変化)など、様々な分野で広く利用できることが期待できるといふ、優れた作用・効果がもたらされる。

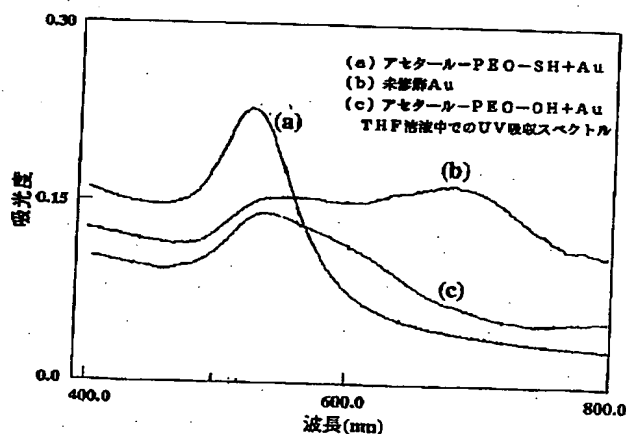
【図面の簡単な説明】

【図1】 反応式1による、化合物(1)~(3)の¹H-NMR (溶媒DMSO、400MHz)スペクトル

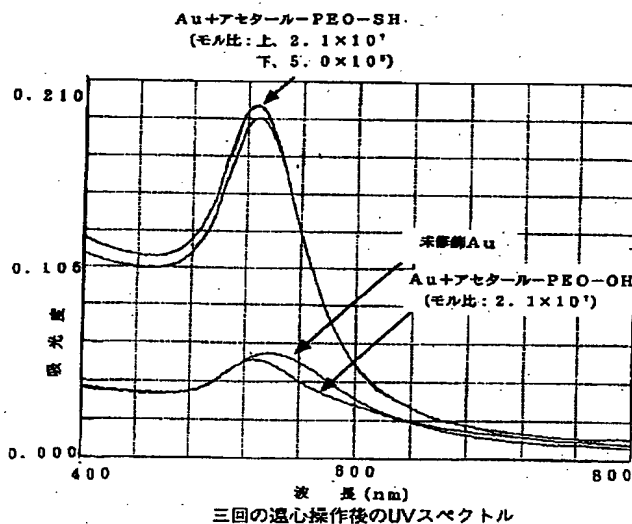
【図2】 (a)本発明の複合体、(b)未修飾金微粒子、(c)α-末端OHのPEGとの複合体、のUV吸収(凝集性)

【図3】 図2の(a)~(c)に対応する複合体または超微粒子の酸系(pH3:HCl)における分散安定性(UV吸収測定)

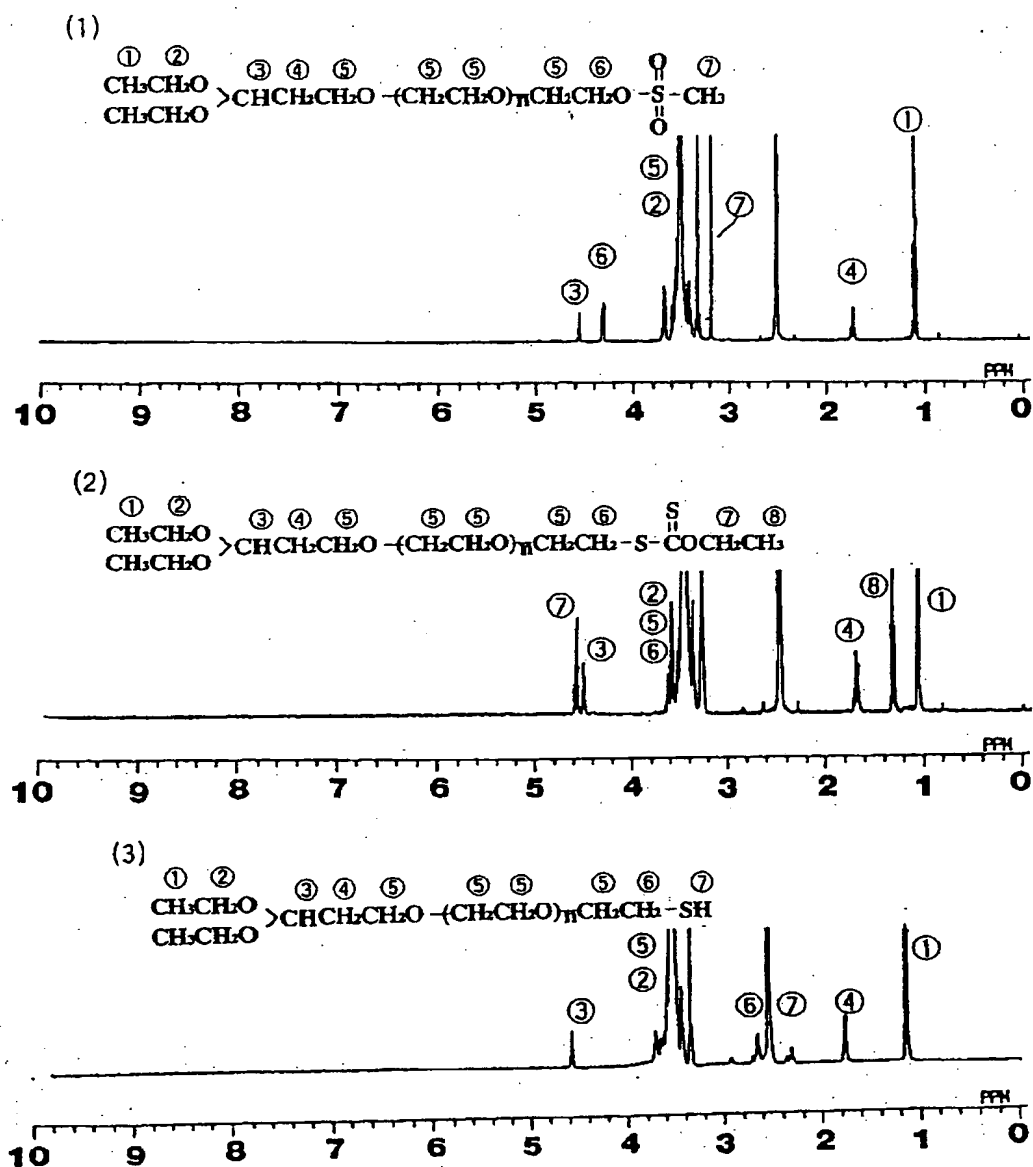
【図2】



【図3】



【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.

G01N 21/65

// B01J 13/00

識別記号

F I

G01N 21/65

B01J 13/00

テーマコード (参考)

Z

(72) 発明者 大塚 英典

神奈川県川崎市中原区井田中ノ町11-13

(72) 発明者 秋山 好嗣

千葉県流山市西深井838-1 ヴィラ運河

4=E

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA01 BA14 CA03 DA02
EA03 EA13 GA07 GB21 KA03
4G065 AA01 AA04 AB02Y AB10Y
AB21Y AB28Y BA07 BB01
BB06 CA01 DA01 DA02 DA06
DA10
4H048 AA03 AB99 VA57 VA58 VB70
4J005 AA03 BD04 BD06 BD08
4J037 AA04 AA08 CC25 DD05 EE08
EE28 EE43 FF15 FF30